

مقایسه دو موتاژن تضعیف شده شیمیایی میتومایسین C و فیزیکی UV (اشعه فرابنفش) از نظر میزان تأثیر بر ژنوم در سلول های لنفوسیتی

محمد علی حسین پور فیضی*، سیامک اکبری کامران و**

چکیده:

زمینه و هدف: بحرانی ترین تأثیر عوامل موتاژن بر ساختار ژنومی انسان، زمینه سازی برخی از ناهنجاریها و اختلالات با پیش زمینه ژنتیکی است. میتومایسین C و UV (اشعه فرابنفش) دو موتاژنی هستند که در مراکز بهداشتی و درمانی کاربرد وسیعی دارند، اما میزان تأثیرات و شدت و حدت آنها بر ژنوم سلول های طبیعی نامعلوم است. لذا در این مطالعه دو نوع موتاژن فوق، که بر اساس شاخص میتوزی تضعیف شده بودند، از نظر میزان تأثیر ناپایداری ژنومی مقایسه گردید تا اهمیت موتاژن های ضعیف فیزیکی یا شیمیایی، بیشتر مورد توجه قرار گیرد. روش مطالعه: به این منظور، تعداد ۱۰۵ لنفوسیت خون محیطی جداسازی شده با فایکول، در فلاسکهای T25 حاوی ۵ ml محیط کشت کامل F12 (۲۰-۱۵ درصد FCS) و میتوزن T لنفوسیت PHA (فیتوهمگلوتنین) و در حضور BrdU (Bromo deoxy Uridine) کشت داده شد. به صورتی که سه نمونه از فلاسک های سلولی، دارای غلظت های تضعیف شده ۳ ng/ml، ۶ ng/ml و ۹ ng/ml از میتومایسین C بوده و دو نمونه دیگر از آنها، در فاصله ۲۰ cm از لامپ UV (شدت فرابنفش C، ۴۲۰ Lux) به طور مجزا و در دو زمان ۳ و ۵ دقیقه، تحت پرتوتابی قرار گرفته، به همراه همان تعداد سلول لنفوسیتی به عنوان شاهد، در دمای ۳۷ °C انکوبه گردید. با برداشت سلول های متافازی بعد از ۷۲ ساعت از زمان کشت و رنگ آمیزی آنها با روش Sister Chromatid SCE (Exchange)، میانگین درصد تعداد تعویض های کروماتید خواهری در کروموزوم های پلاک های متافازی حاصل، مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: مطالعه سلول های تیمار شده با هر دو موتاژن تضعیف شده و نمونه شاهد از نظر SCE، نشان داد که درصد تبدلات کروماتید خواهری در سلول های تیمار شده با MMC (Mitomycin C) با غلظت های ۳ ng/ml، ۶ ng/ml و ۹ ng/ml به ترتیب ۵/۴۳، ۷/۱ و ۸/۱۳ درصد بوده و در سلول های در معرض UV، به مدت ۳ و ۵ دقیقه به ترتیب ۴/۳۴ و ۶/۸ درصد می باشد، در حالی که این میزان در سلول های شاهد ۳/۳۵ درصد تعیین گردید. آنالیز آماری نتایج حاصل، معنی دار بودن تمامی داده ها را نشان داده است ($P < 0.001$).

نتیجه گیری: نتایج بدست آمده نشان می دهد که هر دو موتاژن شیمیایی و فیزیکی تضعیف شده، موجب ناپایداری ژنومی گردیده است و از این نظر اختلاف فاحشی بین دو نوع موتاژن شیمیایی یا فیزیکی وجود ندارد. اما MMC که بعنوان یک دارو با دوزهای بالاتر از مقادیر فوق جهت شیمی درمانی بیماران سرطانی استفاده می شود، قادر به تأثیر بر سلول های سالم غیر توموری بوده و زمینه را برای جهش های احتمالی فراهم می سازد. زمان اندک تابش دهی UV نیز مانع از تأثیرات این نوع موتاژن نگردیده است و با توجه به احتمال حضور این نوع پرتو در جو، بخاطر تحلیل تدریجی لایه ازن، برای سلامتی بشر در آینده یک تهدید جدی تلقی می شود. مطالعه حاضر اهمیت موتاژن های محیطی ضعیف را نشان داده و مقادیری را که بتوان برای تقلیل اثرات MMC و UV در سلول های سالم استفاده کرد، مشخص می نماید.

واژه های کلیدی: میتومایسین C، UV، ناپایداری ژنومی.

استاد گروه زیست شناسی جانوری - دانشگاه تبریز: خیابان آزادی، نبش گلگشت، پارک علم و فناوری، تلفن: ۳۳۵۲۲۶۱ - ۰۴۱۱،

Email: info@ea-sciencepark.org.ir. (مؤلف مسئول).

** مربی گروه زیست شناسی جانوری - دانشگاه تبریز.

مقدمه:

افزایش روز به روز موتاژن های محیطی، تهدید کننده جدی بر سلامت انسان است، چراکه با افزایش تعداد جهش های ناخواسته در ژنوم سلول ها و محدودیت توانایی ترمیمی DNA، امکان بروز بیماری هایی با پیش زمینه ژنتیکی افزایش می یابد (۱۰). این موتاژن ها یا بصورت ناخواسته در محیط وجود دارند و یا درمانی خود، ناچار به استفاده برخی از آنها است، که از جمله می توان MMC (Mitomycin C) و UV (Ultraviolet) را نام برد.

میتومایسین C، نه تنها در شیمی درمانی کاربرد وسیعی داشته، بلکه در درمان سرطان های سرویکس، آدنوکارسینومای معده، پانکراس و ریه نیز تجویز می شود، از طرفی دیگر به عنوان یک آنتی متابولیت، در پیشگیری از عوارض برخی از جراحی های خاص مورد استفاده قرار می گیرد (۹،۷).

میتومایسین C، یک آنتی بیوتیک از منشأ قارچ *Caespitosus-Streptomyces* بوده که یک کلاستوژن حاوی کینون، کربومات و گروه های آزدیرین است. این ترکیب یک عامل آلکیل کننده ایجاد می کند که بصورت متقاطع، به DNA متصل می گردد. سلول های ریشه ای هیپوکسیک تومور های جامد، در محیطی قرار دارند که مستعد انجام واکنش های احیاء بوده و به اثرات سیتوتوکسیکی میتومایسین C حساس تر از سلول های نرمال و اکسیژن دار هستند. میتومایسین C، آلکیل کننده در چرخه غیر اختصاصی سلول و وابسته به S بوده و پیوند های متقاطع با DNA تشکیل می دهد (۸).

فرابنفش نیز یکی از تشعشعات غیر یونیزان در طیف امواج الکترومغناطیسی بوده و در محدوده طول موج ۱۰۰ نانومتر (با انرژی فوتونی تقریباً ۱۲ الکترون

ولت) تا ۴۰۰ نانومتر قرار دارد. فرابنفش را می توان به سه ناحیه طول موجی، فرابنفش A (با طول موج ۳۱۵-۴۰۰ نانومتر)، فرابنفش B (با طول موج ۲۸۰-۳۱۵ نانومتر) و فرابنفش C (با طول موج ۱۰۰-۲۸۰ نانومتر) تقسیم بندی کرد. نوع C فرابنفش با داشتن پایین ترین طول موج، شدیدترین نوع آسیب های جانبی را بر موجودات زنده و بویژه انسان دارد. اگرچه این نوع پرتو، بطور کامل، توسط لایه ازن جذب می شود، اما کاهش ضخامت لایه ازن، احتمال افزایش نفوذ این نوع پرتوها را بیشتر کرده است (۱۱،۴). UV-C با داشتن آثار سوء بر ساختار موجودات زنده، در پزشکی کاربردهای مختلفی داشته و از خاصیت میکروب کشی آن در آلودگی زدائی اطاق های عمل و همچنین در جهت التیام برخی از زخم ها استفاده می گردد (۵).

جهت بررسی آسیب پذیری ژنوم در مقابل یک عامل محیطی، می توان از روش SCE (Sister Chromatid Exchange) که نمایان کننده قدرت ترمیم طبیعی DNA است، استفاده کرد (۱). SCE جایگاه خاص موتاسیون را بهتر نمایان می سازد و بوسیله موتاژن های شیمیایی، بهتر از عوامل فیزیکی القاء، می گردد (۳). در این روش تعداد تعویض های کروماتید خواهری در کروموزوم سلول ها، به عنوان شاخصی برای ناپایداری ژنومی و به عنوان یک روش حساس سیتوژنتیکی کاربرد وسیعی دارد (۲).

در این پژوهش تأثیر دو موتاژن شیمیایی و فیزیکی ضعیف شده از نظر میزان تأثیرات نامطلوب بر ساختار ژنوم مورد مقایسه قرار می گیرد و از طرفی با توجه به طیف وسیع کاربرد این عوامل در پزشکی، میزانی از غلظت موتاژن شیمیایی و یا زمان تابش دهی

که بتواند حداقل تأثیرات را بر ساختار سلول ها داشته باشد، مشخص می گردد.

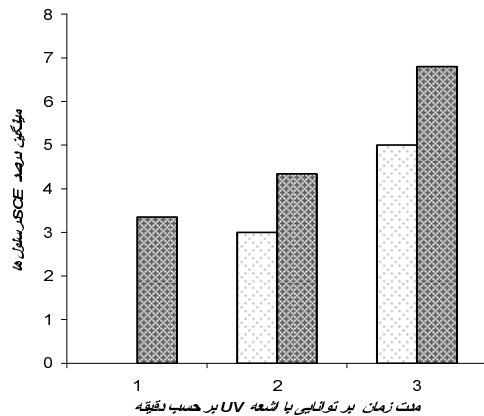
مواد و روشها:

مرحله اول این پژوهش، تضعیف موتازن های مورد مطالعه بود، به حدی که بعنوان یک موتازن ضعیف تلقی شوند، چراکه در حالت معمول، این دو موتازن جزو موتازن های قوی هستند و اثرات سوء آنها بر سلول ها کاملاً معلوم است. برای تعیین میزان قدرت موتازن ها جهت تضعیف، از شاخص میتوزی استفاده گردید. به این صورت که غلظت های مختلفی از MMC و زمان های مختلف تابش دهی UV در معرض تعداد معینی از سلول های لنفوسیتی و در حضور میتوزن فیتوهمگلوتنین (PHA) کشت شده و بعد از ۷۲ ساعت از زمان آغاز کشت، تعداد سلول های میتوزی نمونه های مورد مطالعه به همراه نمونه شاهد شمارش شده، مشاهده گردید که در مورد MMC غلظت ۱۰ ng/ml، شاخص میتوزی تقریباً مشابه با نمونه شاهد دارد، لذا غلظت های پایین تر از آن به عنوان موتازن ضعیف شده برای این مطالعه، انتخاب گردید و در مورد UV نیز زمان تابش دهی ۵ دقیقه، شاخص میتوزی مشابه با نمونه شاهد داشته، لذا زمان های تابش دهی پایین تر از ۵ دقیقه بعنوان موتازن ضعیف شده UV، انتخاب گردید. بعد از انتخاب موتازن های ضعیف شده، تعداد ۱۰۵ سلول لنفوسیتی جدا سازی شده با محلول فایکول را در ۵ ml محیط کشت کامل F12 (۲۰ الی ۱۵ درصد FCS) حاوی میتوزن فیتوهمگلوتنین (PHA)، برای تحریک سلول های لنفوسیتی (۱/۵ میلی لیتر درصد) کشت داده شد، که یکی از محیط ها، بعنوان شاهد و سه محیط دیگر که دارای غلظت های انتخابی ۳ ng/ml، ۶ ng/ml و ۹ ng/ml MMC (نانوگرم) بود و علاوه بر آنها دو نمونه دیگر که به فاصله ۲۰

سانتی متری از لامپ میکویولوزی UV (تولید کننده UV-C به شدت ۴۲۰ LUX، اندازه گیری شده با Luxmeter) و به مدت های انتخابی ۳ و ۵ دقیقه در آغاز زمان کشت تحت تابش دهی بود، بعنوان نمونه های آزمون انتخاب گردید. ۲۴ ساعت بعد از انتقال سلول ها، در هریک از محیط ها، BrdU در غلظت ۵ میکروگرم در میلی لیتر اضافه شده و بعد از ۴۸ ساعت دیگر، با افزودن محلول کلشی سین با غلظت ۱۰ میکروگرم در لیتر به مدت ۱۰۰ دقیقه، عمل محصول برداری سلول های متافازی انجام گردید. لامهای تهیه شده حاوی پلاک های متافازی، به مدت ۱۵ دقیقه در محلول آماده رنگ هوخست (Hoechst 33258) با غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر قرار گرفته و بعد از شستشو، لام ها در محلول بافری SCC ۲× (۰/۳ مولار کلرید سدیم + ۰/۳ مولار سترات سدیم) غوطه ور شده و در زیر نور لامپ UV (ماوراء بنفش) ب مدت ۲۰ دقیقه در فاصله ۴ cm قرار داده شدند. سپس لام ها شستشو و در محلول بافری، در دمای ۶۵°C ب مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفتند و بعد با رنگ گیمسای یک درصد به مدت دو تا سه دقیقه، عمل رنگ آمیزی انجام شد. تعداد یکصد پلاک متافازی از هر تیمار با استفاده از میکروسکوپ نوری با درشتنمایی ۱۰۰۰× مورد بررسی قرار گرفت (۶). آنالیز SCE با شمارش تعداد تعویض های کروماتیدی، که از روی ناپیوستگی رنگ شدگی کروماتید ها مشخص می شود، بررسی گردید. هر نقطه ای از کروماتید که حاوی ناپیوستگی رنگی باشد، بعنوان یک تعویض کروماتید خوانده شناخته می شود (۲).

نتایج:

مطابق نمودارهای زیر، مطالعه پلاک های متافازی تهیه شده با تکنیک SCE، در تصویر شماره ۱



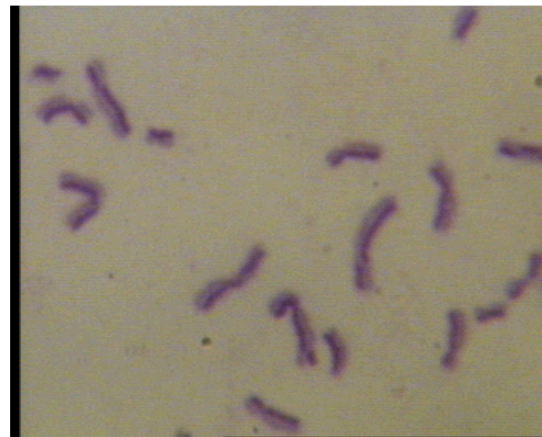
نمودار شماره ۲: میانگین میزان درصد SCE در سلولهای لنفوسیتی شاهد و پرتوتابی شده با UV در ۳ و ۵ دقیقه

میزان آن در سلول های پرتوتابی شده با UV به مدت ۳ و ۵ دقیقه به ترتیب ۴/۳۴ درصد و ۶/۸ درصد بوده است (نمودار شماره ۲). آنالیز آماری، با روش ناپارامتری ویلکاکسون، معنی دار بودن نتایج حاصل را نشان داد ($P < 0.001$).

بحث:

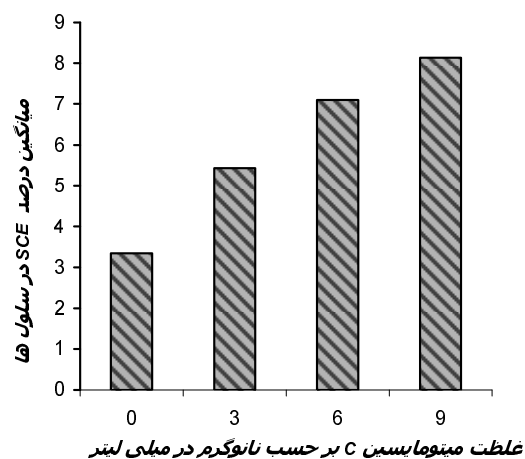
نتایج حاصله اهمیت موتاژن های ضعیف شده در ناپایدار نمودن ژنوم سلول ها را نشان می دهد. به طوری که هر دو موتاژن شیمیایی و فیزیکی تضعیف شده، موجب ناپایداری ژنومی گردیده است و اختلاف فاحشی بین دو نوع موتاژن شیمیایی یا فیزیکی از نظر تأثیر بر ژنوم وجود ندارد.

SCE در سلول های تیمار شده با سه غلظت MMC افزایش دارد، به طوری که SCE که در سلول های طبیعی شاهد ۳/۳۵ درصد بوده، در سلول های تیمار شده با غلظت ۳ ng/ml MMC به ۵/۴۳ درصد و در غلظت های ۶ ng/ml و ۹ ng/ml MMC به ترتیب به ۷/۱ و ۸/۱۳ درصد افزایش یافته است. با توجه به اینکه دوزهای تجویزی این دارو در حد میلی گرم



تصویر شماره ۱: پلاک کروموزومی تهیه شده با روش SCE که تبادلات کروماتیدی را نشان می دهد.

UV در گروههای کنترل و تیمار شده با سه غلظت MMC و دو زمان تابش دهی نشان داد که میانگین درصد SCE در سلول های لنفوسیت های طبیعی ۳/۳۵ درصد بوده، در حالی که این مقدار در همان نوع سلول و با همان ژنوتیپ ولی تیمار شده با سه غلظت، ۶ و ۹ ng/ml MMC به ترتیب به ۵/۴۳، ۷/۱، ۸/۱۳ درصد افزایش پیدا کرده بود (نمودار شماره ۱). درحالی که



نمودار شماره ۱: میانگین میزان درصد SCE در سلول های لنفوسیتی شاهد و تیمار شده با میتومايسين C در غلظت های نانوگرم

می باشد، لذا احتمال در معرض قرارگیری سلول های طبیعی با غلظت های بالاتر وجود دارد، بنابراین چنین محتمل است که با کاهش غلظت و پایین آوردن دوز مصرفی می توان به میزان قابل توجهی از اثرات سوء این دارو بر ژنوم سلول میزبان را کاهش داد. لذا بیماران شیمی درمانی شده با MMC، دارای ژنوم های ناپایدار بوده و مستعد جهش های ژنتیکی هستند.

همچنین نتایج مشخص می کند که میزان SCE در سلول های پرتوتابی شده با UV به مدت ۳ دقیقه، به میزان ۹۹٪ درصد و در پرتوتابی ۵ دقیقه ای، به مقدار ۳/۴۵ نسبت به سلول های شاهد افزایش یافته است. بنابراین آثار سوء این نوع پرتو ها، بر ساختار DNA در کنار سایر اثرات مضر آن مورد تأیید واقع شده، طوری که زمان تابش دهی UV-C نیز در افزایش میزان SCE نقش بسزایی داشته است. پس می توان چنین فرض نموده که قرارگیری در معرض پرتوهای UV-C اثرات سویی به DNA سلولی داشته و ژنوم را برای آسیب های جبران ناپذیر دیگر مستعد می نماید. همچنین کاربرد مفید این نوع پرتوها در کنار آثار مضر آن، مراقبت ها و

احتیاط های لازم را جهت تقلیل این اثرات و آسیب ها می طلبد. بنابراین UV-C به عنوان یک موتازن محیطی، تهدید کننده سلامتی بشر بوده و در سلول ها، موجب ناپایداری ژنومی شده که می تواند آسیب های شدید DNA را باعث گردیده و موجب افزایش برخی از بیماری ها و معضلات بهداشتی درمانی در آینده ای نه چندان دور گردد.

در کل می توان نتیجه گرفت که موتازن های ضعیف، که روز به روز بر میزان آنها افزوده می شود باید مورد توجه جدی قرار گیرند، چراکه همین موتازن ها اثرات جبران ناپذیر ژنتیکی را می توانند بر سلول ها داشته باشند. همچنین مطالعه سایر موتازن های محیطی با این روش در جهت آگاهی از اثرات آنها حائز اهمیت است.

تشکر و قدردانی:

تحقیق حاضر حاصل تلاش همکاران آزمایشگاه رادیوبیولوژی و گروه جانوری دانشکده علوم طبیعی دانشگاه تبریز بوده که کمال تشکر و امتنان را از این عزیزان داریم.

References:

1. Aghamohammadi SZ.; Savage JRK. A pulse brdu method for SCE. Mutation Res, 216: 259-65, 1989.
2. Arvind B.; Ram SV. Human chromosome: From McGraw Hill. NewYork: USA, 143-55, 1995.
3. Astemborski JA.; Budacz AP.; Boughman JA.; Cohen MM.; et al. Repeated measurement of spontaneous and clastogen-induced sister chromatic exchange. Mutation Res, 234: 51-9, 1990.
4. Balasubramanian D. Ultraviolet radiation and cataract. J Ocul Pharmacol Ther, 16(3): 285-97, 2000.
5. Banrud H.; Moan J. Use of short wave ultraviolet radiation for disinfection in operating rooms. Tidsskr Nor Laegeforen, 10, 119(18): 2670-3, 1999.
6. Conner MK.; Wald N. Chromosomal methods in population studies. Environ Health Perspect, 42: 107-13, 1981.

7. Fujishima H.; Ishioka M.; Shimazaki J.; Shimmura S; et al. Trabeculectomy with mitomycin C for post-keratoplasty glaucoma. Br J Ophthalmol, 84: 714-17, 2000.
8. Katzvng BQ. Basic and clinical pharmacology: From McGraw Hi11. NewYork: USA, 286-304, 1998.
9. Kloth LC. Physical modalities in wound management: UVC, therapeutic heating and electrical stimulation. Ostomy Wound Manage, 41(5): 18-27, 1995.
- 10.Schmutte C.; Fishel R. Genomic instability: First step to carcinogenesis. Anti Cancer Res, 19: 4665-96, 1999.
11. World Health Organization. Ultraviolet Radiation. WHO Press, USA, 1-20, 1998.

